



(19) RU (11) 2 194 761 (13) C2  
(51) МПК<sup>7</sup> C 12 Q 1/68

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001106810/14, 15.03.2001  
(24) Дата начала действия патента: 15.03.2001  
(46) Дата публикации: 20.12.2002  
(56) Ссылки: RU 2143004 C1, 20.12.1999. RU 95/10871 A1, 10.06.1997. RU 2116349 C1, 10.05.2000. RU 2146707 C1, 20.03.2000.  
(98) Адрес для переписки:  
125167, Москва, Новозыковский пр-д, 4а,  
Гематологический научный центр РАМН,  
патентный отдел

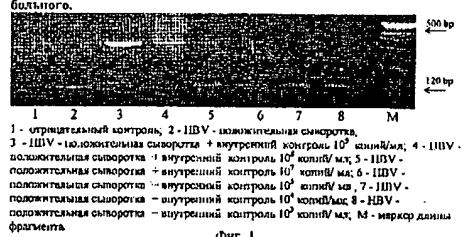
(71) Заявитель:  
Гематологический научный центр РАМН  
(72) Изобретатель: Февралева И.С.,  
Пичковская В.А., Судариков А.Б.  
(73) Патентообладатель:  
Гематологический научный центр РАМН

(54) СПОСОБ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК МЕТОДОМ КОНКУРЕНТНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и касается способа определения внутреннего стандарта для количественного определения ДНК методом конкурентной полимеразной цепной реакции. Сущность изобретения: клонирование ДНК, отличающейся по размеру от выявляемой и амплифицирующейся с теми же праймерами, что и определяемая ДНК, в плазмиду, которая может быть выделена из *E. coli*, при этом ПЦР проводят при пониженной температуре отжига, что приводит к образованию неспецифических продуктов реакции, отличных по длине от определяемой ДНК,

которые используют в качестве внутреннего стандарта в ПЦР. Преимущество изобретения заключается в упрощении способа и создании универсального стандарта. 2 ил.

Определения количества ДНК вируса гепатита В в сыворотке



1 - отрицательный контроль; 2 - ИВ - положительная сыворотка; 3 - ИВ - положительная сыворотка + внутренний контроль 10<sup>0</sup> копий/мл; 4 - ИВ - положительная сыворотка + внутренний контроль 10<sup>1</sup> копий/мл; 5 - ИВ - положительная сыворотка + внутренний контроль 10<sup>2</sup> копий/мл; 6 - ИВ - положительная сыворотка + внутренний контроль 10<sup>3</sup> копий/мл; 7 - ИВ - положительная сыворотка + внутренний контроль 10<sup>4</sup> копий/мл; 8 - ИВ - положительная сыворотка + внутренний контроль 10<sup>5</sup> копий/мл; M - маркер длины фрагмента

R U 2 1 9 4 7 6 1 C 2

R U 2 1 9 4 7 6 1 C 2



(19) RU (11) 2 194 761 (13) C2  
 (51) Int. Cl. 7 C 12 Q 1/68

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2001106810/14, 15.03.2001  
 (24) Effective date for property rights: 15.03.2001  
 (46) Date of publication: 20.12.2002  
 (98) Mail address:  
 125167, Moskva, Novozykovskij pr-d, 4a,  
 Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN,  
 patentnyj otdel

(71) Applicant:  
 Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN  
 (72) Inventor: Fevraleva I.S.,  
 Pichkovskaja V.A., Sudarikov A.B.  
 (73) Proprietor:  
 Gematologicheskij nauchnyj tsentr RAMN

(54) METHOD OF CONSTRUCTION OF INTERNAL STANDARD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF DNA BY METHOD OF COMPETITIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, molecular biology.  
 SUBSTANCE: invention relates to method of determination of internal standard for quantification of DNA by method of competitive polymerase chain reaction. Method involves DNA cloning distinguishing by size from DNA to be isolated but amplifying with the same primers as assayed DNA that can be isolated from *E. coli* cells. Polymerase chain reaction (PCR) is performed at decreased annealing point that results to formation of nonspecific reaction products that differ from DNA to be assayed by their length size and used as internal standard in

PCR. The advantage of invention involves simplification of method and development of universal standard. EFFECT: improved method of standard making. 1 cl, 1 dwg, 2 ex

Определение количества ДНК вируса гепатита В в сыворотке больного.

1 - внутренний контроль, 2 - HBV - поликлиническая сыворотка, 3 - HBV - поликлиническая сыворотка + внутренний контроль 10<sup>3</sup> копий/мл, 4 - HBV - поликлиническая сыворотка + внутренний контроль 10<sup>4</sup> копий/мл, 5 - HBV - поликлиническая сыворотка + внутренний контроль 10<sup>5</sup> копий/мл, 6 - HBV - поликлиническая сыворотка + внутренний контроль 10<sup>6</sup> копий/мл, 7 - HBV - поликлиническая сыворотка + внутренний контроль 10<sup>7</sup> копий/мл, 8 - HBV - поликлиническая сыворотка + внутренний контроль 10<sup>8</sup> копий/мл, M - маркер длины фрагмента.

Фиг. 1

R U 2 1 9 4 7 6 1 C 2

R U 2 1 9 4 7 6 1 C 2

Изобретение относится к областям молекулярной биологии и медицины, в которых возникает задача количественной оценки определенной последовательности ДНК, в частности к созданию медицинских диагностикумов для количественного определения выявляемой методом ПЦР последовательности ДНК в биологических жидкостях и тканях. Нами разработан способ конструирования внутреннего стандарта для количественного определения ДНК в конкурентной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Внутренний стандарт, добавленный в тестируемую пробу, позволяет оценить концентрацию искомой последовательности ДНК и избежать возможности получения ложноотрицательного результата. Внутренний стандарт представляет фрагмент ДНК, имеющий длину, отличную от длины ампликона (участка ДНК, выбранного для амплификации), но общие с ним районы, связывающие праймеры в ПЦР. Таким образом, внесенный в пробу внутренний стандарт и выявляемая последовательность конкурируют за связывание с праймерами и амплификацию в ПЦР. Равные количества продуктов будут амплифицированы в том случае, когда начальные концентрации и того и другого равны. Следует отметить, что при разработке подобных диагностикумов основную трудность представляет конструирование внутреннего стандарта. Ниже приведена работа авторов Ballagi-Pordany A., Belak S. (1), в которой предложен, на наш взгляд, наиболее простой способ конструирования внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта в ПЦР-системе для определения вируса бычьеи лейкемии авторы использовали модифицированный фрагмент ДНК гена человеческого  $\beta$ -актина, в который были введены участки, комплементарные праймерам, для определения вируса бычьеи лейкемии. Для этого были синтезированы олигонуклеотиды, 3' концы которых являлись праймерами к  $\beta$ -актину, а 5' концы содержали последовательности, комплементарные праймерам для выявления вируса бычьеи лейкемии. С синтезированными олигонуклеотидами из ДНК  $\beta$ -актина была проведена ПЦР. В результате реакции был получен продукт, который в дальнейшем мог амплифицироваться как со своими праймерами, так и с праймерами для выявления вируса бычьеи лейкемии, что позволило использовать его в качестве внутреннего стандарта для количественного определения последнего.

Метод, предлагаемый нами, не требует, в отличие от прототипа, длительной генно-инженерной работы по модифицированию исходной последовательности ДНК, на базе которой конструируется внутренний стандарт. Мы предлагаем новый способ конструирования внутреннего стандарта для разработки количественных ПЦР-диагностикумов, основанный на том, что при температуре, существенно меньшей, чем оптимальная температура отжига в ПЦР, специфичность взаимодействия "праймер-матрица" снижается, и при этих низких температурах в реакции с произвольной ДНК и праймерами, разработанными для определяемой ДНК,

образуется множество неспецифических ПЦР-продуктов, амплифицирующихся с данными праймерами, и, следовательно, коамплифицирующихся с выявляемой ДНК. Полученные ПЦР-продукты, являющиеся фрагментами ДНК, отличными по длине от выявляемого ампликона, после выделения и очистки можно использовать в качестве внутреннего стандарта для выявления искомой ДНК.

Описание предлагаемого способа конструирования внутреннего стандарта для количественного определения ДНК.

Для конструирования внутреннего стандарта мы предлагаем использовать произвольную ДНК и праймеры, разработанные для выявления искомой ДНК. С произвольной ДНК и праймерами проводят ПЦР, причем в первых пяти циклах температура отжига на 15-20°C ниже температуры, оптимальной для данной пары праймеров, а во всех последующих циклах отжиг осуществляется при оптимальной температуре. Таким образом, в первых пяти циклах образуются неспецифические фрагменты ДНК различной длины, амплифицирующиеся с данными праймерами. При дальнейшей ПЦР эти фрагменты нарабатываются в количестве, достаточном для визуализации в агарозном геле. Полученный ПЦР-продукт представляет собой смесь фрагментов ДНК различной длины, каждый из которых может служить внутренним стандартом в конкурентной ПЦР для определения наличия и количества данного патогена. Далее выбирают фрагмент, наиболее удобный по длине для использования в качестве внутреннего стандарта.

Выбранные фрагменты впоследствии могут быть клонированы в плазмиду, соответствующая плазмиды выделена из *E. coli*, и после подсчета количества копий плазмидной ДНК в миллилитре водного раствора такие растворы могут быть использованы в качестве внутреннего стандарта для определения концентрации искомой ДНК методом конкурентной полимеразной цепной реакции.

Пример 1: разработка диагностикума для количественного определения ДНК вируса гепатита В в сыворотке крови человека

В качестве исходной пробы при конструировании внутреннего стандарта для количественного определения ДНК вируса гепатита В в сыворотке крови человека была взята кДНК, полученная из мононуклеарных клеток крови человека.

ПЦР к ДНК, мкл - 5

10•Буфер (100mM Tris, pH8.3, 50mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 40% формамид) - 2,5  
dNTP, 2mM, мкл - 2,5

Праймер Hba, 1мкМ, мкл - 2,5

Праймер Hbs, 1мкМ, мкм - 2,5

ТАQ полимераза, ед - 5

Деионизованная вода, мкл - До 25

Реакцию амплификации проводили в программируемом термостате при следующем температурном режиме:

Первые 5 циклов, °C/c:

94 - 15

37 - 15

72 - 15

Последующие 30 циклов, °C/c:

94 - 15

56 - 15

72 - 15

Анализ ПЦР-продукта осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Далее полученный ПЦР-продукт высаживали 96% этиловым спиртом, осадок растворяли в 20 мкл  $H_2O$  и легировали в плазмиду pGem-T Easy с последующей трансфекцией в E-coli путем электропорации. Селекцию клеток проводили на чашках Петри с питательной средой в присутствии ампициллина, 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактозида и изопропилгальактозида. Была отобрана колония клеток, содержащих вектор со вставкой длиной 500 пар оснований. Отобранные клетки были протестированы в ПЦР с праймерами для выявления вируса гепатита В. Полученный в реакции амплификат имел, как и ожидалось, длину 500 пар оснований. Далее, отобранные клетки были размножены в среде 2YT с ампициллином, плазмидная ДНК была выделена, очищена и растворена в воде в концентрации  $10^{10}$  копий плазмиды в 1 мл. Таким образом, в результате был получен внутренний стандарт - раствор плазмидной ДНК, имеющей район, коамплифицирующийся в ПЦР с определяемой ДНК, в данном случае ДНК вируса гепатита В.

Был проведен количественный анализ сывороток крови человека на наличие вируса гепатита В. Пробы для анализа были приготовлены по методике, запатентованной нами ранее (2). Коротко: 50 мкл сыворотки были разведены в буфере, содержащем дегидратант NP-40 и диметилсульфоксид, смесь была прогрета при 95°C в течение 10 мин, после чего образовавшийся сгусток был осажден центрифугированием, а супернатант разлит по 2,5 мкл в пробирки для PCR, за исключением первой пробирки, куда было добавлено 5 мкл  $H_2O$  (отрицательный контроль). Во вторую пробирку к сыворотке было добавлено 2,5 мкл  $H_2O$ , а в пробирки с 3-й по 10-ю к сыворотке последовательно добавляли по 2,5 мкл внутреннего стандарта в концентрациях от  $10^9$  до  $10^3$  копий/мл. Электрофорограмма продуктов ПЦР в агарозном геле, содержащем бромистый этидий, приведена на фиг. 1.

Из электрофорограммы видно, что на дорожке N5 - равные количества наработанных в процессе ПЦР продуктов, что означает равенство начальных концентраций

матриц. Поскольку концентрация внутреннего стандарта в данном случае  $10^7$  копий/ мл, следовательно, концентрация вируса в крови больного тоже  $10^7$  копий/ мл.

Пример 2:

Получение внутреннего стандарта для ПЦР-определения рибосомной ДНК грибов.

При конструировании внутреннего стандарта для определения рибосомной ДНК грибов в крови человека, как и в предыдущем примере, взята кДНК, полученная из мононуклеарных клеток крови человека. Использованы следующие универсальные пангрибковые праймеры:

Fu-S - 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC - 3'  
Fu-aS - 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'.

Вся последующая работа описана в предыдущем примере.

В результате получен фрагмент ДНК длиной 500 пар нуклеотидов, содержащий на концах последовательности комплементарные праймерам Fu-S и Fu-aS соответственно. Фрагмент использован в качестве внутреннего положительного стандарта при амплификации участка рибосомной ДНК *Candida albicans* (см. фиг. 2).

Список литературы

1. Mol Cell Probes 1996 Jun; 10(3): 159-64 The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR.

2. Февралева И.С., Судариков А.Б. Способ определения парвовируса Б 19. Патент на изобретение 2146372, Государственный реестр изобретений Российской Федерации, 10 марта 2000 г., Москва.

#### Формула изобретения:

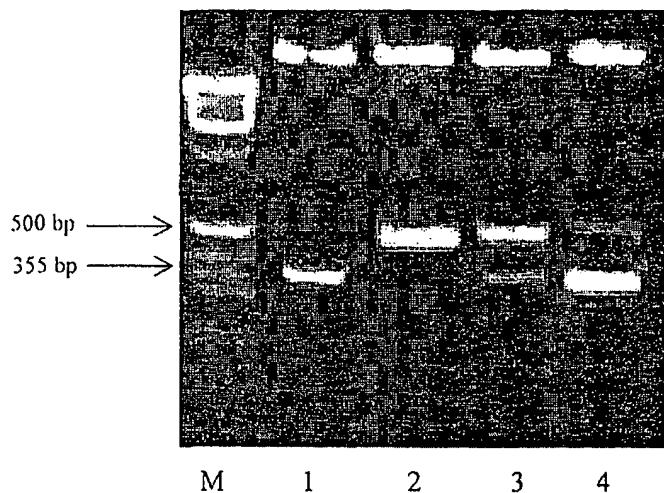
Способ конструирования внутреннего стандарта для количественного определения ДНК в конкурентной полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающий амплификацию в ПЦР и клонирование ДНК с измененным по сравнению с выявляемой ДНК размером и амплифицирующейся с теми же праймерами, что и выявляемая ДНК, и выявление плазмидной ДНК, имеющей район, коамплифицирующийся с выявляемой ДНК, отличающийся тем, что ПЦР проводят с использованием в качестве матрицы производной ДНК при температуре отжига ниже оптимальной для используемых праймеров и неспецифический продукт амплификации, отличный по длине от выявляемого продукта, используют в качестве внутреннего стандарта.

50

55

60

Пример амплификации рибосомной ДНК *Candida albicans* и внутреннего стандарта.



М – маркер длины фрагмента; 1 – положит. контроль на рибосомную ДНК *Candida albicans* (355 bp); 2 – внутренний стандарт (500 bp)+ отриц.контроль; 3 – внутренний стандарт + проба1; 4 - внутренний стандарт + проба2

Фиг. 2

R U 2 1 9 4 7 6 1 C 2

R U 2 1 9 4 7 6 1 C 2